

PREPARATION OF BICYCLOMYCIN

Publication number: JP52108092 (A)
Publication date: 1977-09-10
Inventor(s): IMANAKA HIROSHI; IGUCHI HIDEKO; AOKI HATSUO +
Applicant(s): FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO +
Classification:
- International: C12P1/06; C12P17/18; C12R1/465; C12P1/06; C12P17/18;
(IPC1-7): C12D9/14
- European:
Application number: JP19760025927 19760309
Priority number(s): JP19760025927 19760309

Also published as:
 JP60040838 (B)
 JP1315247 (C)

Abstract of JP 52108092 (A)

PURPOSE: Known antibiotic bicyclomycin is produced by the cultivation of a novel variation belonging to *Streptomyces* species.

.....
Data supplied from the *espacenet* database ---- Worldwide

⑪ 公開特許公報 (A)

昭55-156592

⑫ Int. Cl.³
C 12 P 1/06
// C 12 R 1/01

識別記号

序内整理番号
6760-4B

⑬ 公開 昭和55年(1980)12月5日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 7 頁)

⑭ 抗生物質ゲンタミシンClaの製造法

静岡県田方郡大仁町三福685

⑮ 特願 昭54-60021

静岡県田方郡函南町平井1900の

⑯ 出願 昭54(1979)5月15日

3

⑰ 発明者 藤井忠代

⑰ 発明者 小谷勝

三島市光ヶ丘15の4

静岡県田方郡大仁町田原727の

⑰ 発明者 里井秀三

3

静岡県田方郡函南町柏谷1277の
28

⑰ 出願人 東洋醸造株式会社

⑰ 発明者 武藤直紀

静岡県田方郡大仁町三福632の

1

明細書

1. 発明の名稱

抗生物質ゲンタミシンClaの製造法

2. 特許請求の範囲

(1) ダクチロスピオランジウム属に属する抗生物質ゲンタミシンCla生産菌を培地に培養し、その培養物より抗生物質ゲンタミシンClaを採取することを特徴とする抗生物質ゲンタミシンClaの製造法。

(2) ダクチロスピオランジウム属に属する抗生物質ゲンタミシンCla生産菌が、ダクチロスピオランジウム・タイランダニセ (G 36 7) である特許請求の範囲第1項記載の抗生物質ゲンタミシンClaの製造法。

3. 補明の詳細な説明

本発明は、抗生物質ゲンタミシンCla (Gentamicin Cla) の新規な製造法に関する。

従来より抗生物質ゲンタミシンCla生産菌としては、ミクロモノスボラ・エチノスボラ (Micromonospora echinospora) およびその2変種 (上記同一文献)、ミクロモノスボラ・サガミエンシス (Micromonospora sagamensis) およびその2変種 (特許昭49-42888号)、およびミクロモノスボラ・アルブレア・パリエスター・パープルセイ় (Micromonospora purpurea var. nigrescens) ハンガリー特許第168778号、J. Antibiot. 30: 945 (1977) が知られていた。上記の通り、抗生物質ゲンタミシンCla生産菌は、すべてミクロモノスボラ属 (Micromonospora) に属するものであり、その形態的特徴は基生菌系に一列づつ胞子を形成するものであり、さらにはミクロモノスボラ属はミクロモノスボラ科 (Micromonosporaceae) に属するものである (Bergey's manual of determinative bacteriology 第8版 (1974))。

本発明者は、静岡県富士市の畠土壌より分離米國特許第3091572号、Antimicrob-agents and chemother. 19-6 381, 6, 14, 17 および 116)、ミクロモノスボラ・エチノスボラ (Micromonospora echinospora) およびその2変種 (上記同一文献)、ミクロモノスボラ・サガミエンシス (Micromonospora sagamensis) およびその2変種 (特許昭49-42888号)、およびミクロモノスボラ・アルブレア・パリエスター・パープルセイ় (Micromonospora purpurea var. nigrescens) ハンガリー特許第168778号、J. Antibiot. 30: 945 (1977) が知られていた。上記の通り、抗生物質ゲンタミシンCla生産菌は、すべてミクロモノスボラ属 (Micromonospora) に属するものであり、その形態的特徴は基生菌系に一列づつ胞子を形成するものであり、さらにはミクロモノスボラ属はミクロモノスボラ科 (Micromonosporaceae) に属するものである (Bergey's manual of determinative bacteriology 第8版 (1974))。

本発明者は、静岡県富士市の畠土壌より分離

した放線菌 6367 株が抗生素質ゲンタミシン G-Ia を産生することを見い出し、述べする通り、放線菌 6367 株がダクチロスボランジウム属 (*Dactylosporangium*) に属するもので、その形態的特徴は基生菌糸に胞子のうを産生し、胞子のう中に鞭毛を有する胞子を形成するもので、さちにこのダクチロスボランジウム属はアクトネオアクテス科 (*Actinomycetaceae*) に属するもので、従来のミクロモノスボラ属とは分類学上、明らかに科の段階での相違が認められるもので、抗生素質ゲンタミシン G-Ia の新規な生産菌であると見い出した。

また上記の放線菌 6367 株の菌学的属性は次の通りである。

(Ⅰ) 形態的性状

リング酸カルシウム寒天培地 (Bact. Rev. 2.1 : 1 (1957)) 上、30°C、3-7 日間培養し、観察した所見は次の通りである。

基生菌糸は曲線状または屈曲状で、分枝をなして伸長し、分断せず、直後 $0.5 \sim 0.6 \mu$ であり、

— 3 —

気菌糸は形成しない。

基生菌糸に、大きさ $1.5 \sim 2.0 \times 2.5 \mu$ の球状または棒円状物体の産生が、寒天培地中に幾つかの状態でみられる。

基生菌糸より短かい胞子のう柄を生じ、胞子のうは指形で、寒天培地表面に、1 個または房状に形成する。胞子のうの大きさは、 $1.0 \sim 1.5 \times 4.0 \sim 6.5 \mu$ で、中には 3 ～ 4 個の胞子がたてに一列に入っている。

胞子は水中で運動性があり、形は球形、橢円形または棒状形を呈し、大きさは $1.0 \sim 1.5 \times 1.5 \sim 2.5 \mu$ であり、微弱で房状の鞭毛を有している。

(Ⅱ) シアミノゼメリソ酸組成

全固体分析によるシアミノゼメリソ酸は、メグニ酸およびメゾー型より R 値の低いもの (elution moving diaminopimelic acid) が検出された。

(Ⅲ) 各種培地における生育状態等

各種培地上で、30°C、1-4 日間培養し、観察した所見は次表の通りであり、オート・ミール寒天培地上で寒天培養の気菌糸がわずかに形成される

— 4 —

以外は、気菌糸の形成は認められず、また胞子のうはリング酸カルシウム寒天培地上で良好、土壤寒天培地 (Jgen. Microbiol. 5.9 : 295 (1968)) 上で、中程度であり、その他の培地上で甚わざか、またほとんど形成されなかつた。

なお、色の表示は、カラー・ハーモニー・マニュアル (Color Harmony Manual) 第 4 版 (1958 年 (Container Corporation of America)) による色の分類に従つたものである。

— 5 —

各種培地上における生育状態

培地	生育	茎生菌糸の色	可溶性色素
ショクローク・地衣類寒天培地 (ワックスマン培地No.1)※※	中程度ないし不良	アブリコット[Apricot(41a)]ないしダスティ・オレンジ[Dusty Orange(41c)]	なし
グルコース・アスパラギン寒天培地 (ワックスマン培地No.2)※※	不良	ライト・メロン・イエロー[Light Melon Yellow(3ia)]ないしアブリコット(41a)	なし
グリセリン・アスパラギン寒天培地 (ワックスマン培地No.5)※※	僅少ないし不良	無色ないしライト・メロン・イエロー[Light Melon Yellow(3aa)]	なし
スターク・無機寒天培地 (ワックスマン培地No.4)※※	中程度ないし良好	ルセット・オレンジ[Russet Orange(4nn)]ないしダスティ・オレンジ(41c)	なし
チオシン寒天培地 (ワックスマン培地No.7)※※	僅少ないし不良	アブリコット[Apricot(4ga)]ないしペール・パステル オレンジ[Pale Pastel Orange(4ie)]	なし
オート・ミール寒天培地 (ワックスマン培地No.9)※※	中程度ないし良好	オレンジ・ルート[Orange Rust(4pe)]ないし ルセットオレンジ[Russet Orange(4pc)]	なし
ベースト・オース・ダニエル寒天培地 (ワックスマン培地No.10)※※	なし	メイプル[Maple(4le)]ないしカゲツジ・タン (Luggage Tan(4na))	メイプル(4le)ないしライト・ ブラウン[Light Brown(4ng)]
リング酸カルシウム寒天培地	不良	無色	なし
榮養寒天培地 (ワックスマン培地No.14)※※	僅少	なし	なし

- 6 -

ベネフト寒天培地 (ワックスマン培地No.30)※	中程度ないし良好	メイプル(4le)ないしルカツジ・タン(4ne)	メイプル(4le)ないしライト・ブラウン (4ng)
スマーフン寒天培地 (ワックスマン培地No.28)※	中程度	パステル・オレンジ(4ia)ないしメイプル(4le)	メイプル(4ia)
ハイキー・トレスター寒天培地 (ワックスマン培地No.52)※	中程度ないし良好	シナモン[Cinnamon(5ia)]ないしメイプル (4ie)	メイプル(4le)ないしライト・スペイシ ・ブラウン[Light Spice Brown (4ia)]
グルコース・イースト・エキス寒天 培地(ワックスマン培地No.29)※	中程度	メロン・イエロー[Melon Yellow(3ga)]	なし
ハートン・イースト・エキス寒天 培地(ワックスマン培地No.6)※※	僅少	無色	なし
土壤寒天培地	僅少ないし不良	なし	なし
シャガイキ片 (ワックスマン培地No.49)※	中程度	タイルレッド(Tile Red(5ae))ないしコッパー (Copper(5ic))	なし
シャガイキ片+炭酸カルシウム	なし	なし	なし
エンドン片	僅少	無色	なし

著者: Wakeman, S. A. The Bacteriologist Vol. 2 1961 p. 527-534 Williams & Wilkins co.

※※ Inter. J. Syst. Bact. 16: 313~340 (1966)

※※※ Antimicrob. Agents and Chemother. 1963 p. 115~124

〔IV〕 生理的性状

生理的性状は下記の通りである。

1) 培養基の消化性

炭素源	P & G	L
D-アラビノース	+	+
L-アラビノース	+	+
D-フラクトース	+	+
D-ガラクトース	+	+
D-グルコース	+	+
グリセロール	—	—
L-イノシトール	—	—
D-マンノース	+	+
D-マンロース	+	+
D-メリピオース	+	+
D-ラクトース	+	+
ズルシトール	—	—
D-トレハロース	+	+
D-セロビオース	+	+
メレクトース	+	+
タフタノース	+	—

— 8 —

特開昭55-156592(4)

レーラムノース	+	+
D-リボース	—	—
L-ゾルボース	—	—
D-マルゼトール	—	—
シスクロース	—	+
D-キシロース	+	+
アドニトール	—	—
ザリシン	土～+	土～+
スターチ	+	+
マルトース	+	+
デキストリン	+	+
イタリン	—	—

+: 開性、-: 極開性、—: 陰性

培地: プリドハム・ゴットリープの無機培地

※ 著: Inter. J. Synt. Bact. 23: 240-2

47 (1971) によるルエドマンの有機
培地

2) 生育温度範囲: 20~40°C

3) 脂肪牛乳: ペプトン化および酸化とともに耐
性

— 9 —

4) メラニン様色素の生成: 開性 (チロシンおよびペプトン・イーストエキス・酵母天培地)

5) スターチの加水分解: 開性

6) セルロースの分解: 開性

7) カゼインの分解: 開性

8) チロシンの分解: 開性

9) ゼラチンの液化: 開性

10) 硫化水素の生成: 弱い陽性

11) 硝酸塩の還元: 開性

12) 生育pH: pH 5.5~9.0

上記の通り、本菌G367の特徴としては、基
生菌糸に指形の孢子のうを産生し、孢子のう中に
胞子がたてに一列にならび、胞子に勝状の鞭毛を
有していることにある。

このように、孢子のうを形成し、その中に鞭毛
を有する胞子を形成するものは、アクチノプラネ
ス科 (Actinoplasmataceae) に属するものであつて、
胞子のうが指形で、その中にたてに一列に胞子が
形成されるものは、ダクチロスボランジウム属に
属する。

— 10 —

さらに、本菌G367株は液体培地上で、基生
菌糸が褐色ないし褐色を呈し、褐色の可溶性色
素を生ずる特徴を有することより、ダクチロスボ
ランジウム・タイランダンセ (Dactylosporangium
thailandense) (Arab. Microbiol. 互見: 42~
52 (1967)) に属するものと判定した。

よつて、本菌G367を、ダクチロスボランジ
ウム・タイランダンセG367と命名したもので、
また本菌は工業技術院微生物工業技術研究所に
「申請番号4840号」として申請され
ている。

本発明は上記の知見に基づいて完成されたもので、
ダクチロスボランジウム属に属する抗生素質ケン
タミシンC1a生産菌を培地に培養し、その培養物
より抗生素質ケンタミシンC1aを採取することを
特徴とする抗生素質ケンタミシンC1aの製造法である。

まず本発明を実施するに當り使用されるダクチ
ロスボランジウム属に属する抗生素質ケンタミ
シンC1a (以下単に、ケンタミシンC1aといき) の

— 11 —

生産菌としては、上記のダクテロスボランジウム・タイランデンセ C 367 株がその一例として挙げられるもので、また本発明の使用菌はこれに限定されるものでなく、ダクテロスボランジウム属に属するゲンタミシン C 1a 生産菌であればよく、天然または変異株も使用し得る。

次いで、本発明のゲンタミシン C 1a を製造するに当つて示すすれば、上記のダクテロスボランジウム属に属するゲンタミシン C 1a 生産菌を通常の微生物の培養に使用する培地成分を含む培地にて好気的に培養することによつて得られる。培地としては、固形培地または液体培地が用いられるが、特に大量生産のためには液体培地、特に水性培地が適当である。

培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては同化可能な炭素化合物であればよく、例えはグルコース、シクロトロース、マルトース、スクレア、デキストリン、キラクセなどが使用される。窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、

- 12 -

例えはコーン・ステーブ・リカー、大豆粉、純米粉、小麦グルテン、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、アンモニア水塩、硫酸塩などが使用される。その他、リン酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、ナトリウム、コバルト、鉄、マンガンなどの塩類が必要に応じて使用される。

培養温度は菌が発育し、ゲンタミシン C 1a を生産する範囲内で適宜変更し得るが、熱好ましくは 25 ～ 35 度である。培養時間は、条件によつて多少異なるが、通常 100 ～ 200 時間程度であつて、ゲンタミシン C 1a が最高力値に達する時期を見計つて適当な時期に培養を終了すればよい。

このようにして得られたゲンタミシン C 1a 生産菌の液体培養の培養物中に於いて、ゲンタミシン C 1a は液体部分に大部分產生されている。

次いでこのゲンタミシン C 1a 生産菌の培養物からゲンタミシン C 1a を採取するのであるが、ゲンタミシン C 1a は水溶性の過酸化物アミノ糖化合物であることを利用して分離精製を行なうことが簡便

- 13 -

である。また生産されたゲンタミシン C 1a はペプチド・ズブチリス P C 1219 を被検菌として、通常の寒天被膜法により活性区分の確認、および定量を行なつたものである。

ゲンタミシン C 1a の分離精製手順の一例を示すと次の通りである。すなわちゲンタミシン C 1a 生産菌を前述の如く培養して得られる培養物から固形分を除去して培養液を得るのであるが、ゲンタミシン C 1a がアミノ糖化合物であるためにその培養物の pH を一旦酸性に調整し、これを中和して脱離してその培養液を得ることが好ましく、次いでこの培養液を陽イオン交換樹脂例えばアンペーライト R C - 50 (NH₄⁺型) のカラムにチャージせしめて脱離せしめ、これにより活性物質を 2 N アンモニア水にて溶出せしめ、さらにその溶出液を濃縮した後、その pH を調整し、陽イオン交換樹脂例えば CM - カクアダクタス C - 25 (NH₄⁺型) のカラムにチャージせしめて脱離せしめ、0 ～ 0.35 N の濃度勾配をもたせたアンモニア水にて溶出せしめ、その溶出液分を

得、これを減圧濃縮し、凍結乾燥することによりゲンタミシン C 1a の精製白色粉末を遊離基の型にて得られる。またこのようにして得られるゲンタミシン C 1a は薄層クロマトグラフィーにて一眼スポットを示すものであることが簡便に判知得る。

次いでこのようにして得られた本発明のゲンタミシン C 1a の物理化学的性状を挙れば次の通りである。

分子量

449 (マススペクトルより)

分子式

C₁₄ H₂₀ N₄ O₄

比旋光度

(α)_D²⁵ = +9.6.2 (C = 0.39, H₂O)

ペーパークロマトグラフィー

クロロホルム : テタノール : 1/7 頃アンモニア水 (2 : 1 : 1) R_f = 0.2.2

プロピノール : ポリジン : 酢酸 : 水 = 6 : 4 : 1 : 3 上層液 R_f = 0.2.9

色性状

- 15 -

- 14 -

白色粉末

上記の性状、さらにマススペクトルの各ピーク、核磁気共鳴スペクトルなどより、本発明により得られる化合物が、前記の文献記載のゲンタミシン C_{1a}と同一物質であると同定された。

次に本発明の実施例を挙げて具体的に説明するが、本発明はこれにより何んら限局されるものではない。

実施例 1

デキストリン 1%、グルコース 1%、カゼイン水解物 0.5%、酵母エキス 0.5%、炭酸カルシウム 0.1% を含有する培地 (PH 7.0) 100 ml を 50 ml 容器三角フラスコに分取し、120°C、20 分間加熱殺菌した。本培地 1 本に、各々ダクチロスボランジタム・タイランゲンセ G 3.67 桃の斜面培養液よりの一株金耳を接種し、30°C、120 分間振盪培養した。次いでこれを上記と同一組成の加熱殺菌した培地 200 ml を含有する 30 ml 容器ジャーフアーメンターに移植し、30°C、2 時間、300 rpm、毎分 2.0 l の無菌空気の

- 16 -

特開昭55-156592(6)

条件下で通気攪拌培養した。次いでデキストリン 5%、グルコース 0.5%、炭酸カルシウム 0.1% を含有する加熱殺菌した培地 (PH 7.2) 200 ml を含有する 250 ml 容タンクに上記の培養物 100 ml を移植し、30°C、120 時間、250 rpm、毎分 1.0 l の無菌空気の条件下通気攪拌培養し、培養物約 1.9 l を得た。

次いで、実施例 2 の如くして、その培養物よりゲンタミシン C_{1a}を分離精製するものである。

実施例 2

実施例 1 で得られた培養物を、12N 硝酸水溶液にて PH 2 に調整し、30 分間攪拌した後、アンモニア水にて PH 7.0 に調整し、さらにこれを調節剤としてペーライト (商品名) 4 枚を加えて戻し、次いで得られた培養液を、アンバーライト IR-0-500 (カーム・アンド・ハース社製) (NH₄⁺型) 10 l を充填したカラムにチャージし、水洗した後、2N アンモニア水 2.0 ml にて溶出せしめ、その溶出液を得て、これを

- 17 -

150 ml まで減圧濃縮した。

次いでこの濃縮液を 6N 硝酸水溶液にて PH 7.0 に調整し、これを、CM-セルフアダクタ G-2.5 (クアルマント・アイン・ケミカル社製) (NH₄⁺型) 50 ml を充填したカラム (φ 4 cm) にチャージして活性物質を吸着せしめた。その後該カラムを水洗後、0.5~0.5 N の濃度の配をもたせたアンモニア水よりにより溶出せしめ、溶出液を 20 ml ずつ分取した。各分画について、クロロホルム : メタノール : 2.8% アンモニア水 = 1 : 1 : 1 の下層を無菌密栓とした薄層クロマトグラフィーを行ない、ニンヒドリン発色により目的物を確認した。その結果、第 2~5 分より 2~4.5 分がゲンタミシン C_{1a}のみを含有したものであつた。次いでこの部分を採取。合せて減圧濃縮し、次いで薄層乾燥してゲンタミシン C_{1a} 85 mg を得た。

特許出願人 東洋醸造株式会社
代表者 伊東富士馬

- 18 -

手 練 條 王 資

昭和55年6月1日

特許庁長官 田中源一郎

1. 事件の要旨

昭和55年6月1日特許第55-156592号

2. 说明の名称

・ 抗生物質ゲンタミシン C_{1a}の製造法

3. 指定をする者

事件との関係 特許出願人

住所 特許庁長官大日本工業株式会社の/

名称 東洋醸造株式会社

代表者 伊東富士馬

4. 指定する日付

自発

5. 指定の対象

明細書の説明の誤りを説明の様

6. 指定の内容

明細書第 6 頁第 16 行の

「diaminopimelic」を

「diaminopimelic」と訂正する



開示ノ文第3行の

「セラフィックスリ」を

「セラフィックタス」と訂正する